

CAP. 3. INGINERIE GENETICĂ BACTERIANĂ

Ingineria genetică cuprinde tehnici efectuate în vitro cu gene, cromozomi sau celule întregi în scopul construirii unor structuri reprogramate genetic. Cuprinde o inginerie genetică celulară reprezentată de fuziunea de protoplaști și o inginerie genetică moleculară reprezentată de tehnologia ADN recombinant. Tehnologia ADN recombinant reprezintă un ansamblu de metode prin care se realizează în vitro, molecule de ADN recombinante, permițând, clonarea unor gene de origini diferite, atât în celula procariotă cât și în celula eucariotă. Realizarea acestei tehnologii presupune construirea unor vectori de clonare, izolarea unor gene de interes (denumite inițial ADN pasager, în prezent, ADN heterolog) și utilizarea unui echipament enzimatic corespunzător: endonucleaze de restricție, ADN ligaze, polimeraze, exonucleaze, fosfataze alcaline, revertranscriptaze, terminaltransferaze, etc.

3.1. Vectori utilizați în clonarea genetică la *Escherichia coli*

Vectorii reprezintă molecule de ADN în interiorul cărora se introduc fragmentele de ADN de studiat (ADN pasager, heterolog), ce poate fi de origine pro- sau eucariotă.

Vectorii pot fi clasificați în funcție de diferite criterii:

a) posibilitatea studierii exprimării fragmentelor de ADN pasager, vectorii se împart în: **vectori de clonare** - nu au în structură secvențe de tip *promotor* și, ca atare, permit doar clonarea unor fragmente de ADN pasager, dar nu și analiza exprimării acestora, și **vectori de exprimare** (implicit și de clonare) - au în structură secvențe de tip **promotor**, permițând atât clonarea, cât și analiza exprimării fragmentului clonat.

b) tehnica de clonare folosită, vectorii pot fi: vectori de clonare inserțională - ADN pasager este clonat prin inserție la un situs unic de restricție din vector și **vectori de clonare prin înlocuire (substituție)** - ADN clonat înlocuiește un fragment din vector, în urma digestiei cu 2 endonucleaze de restricție.

c) structura și modul de funcționare, vectorii se împart în: vectori plasmidiali (sunt derivați din, și au structură de plasmide); **vectori virali** (sunt derivați din, și au structura de genom viral); **vectori hibridi - fagimide** (au structură hibridă, de genom de fag filamentos și de plasmid) și **cosmide** (au structură hibridă, de genom de fagλ și de plasmid).

d) spectrul de gazde, există vectori: vectori congenerici (pot fi folosiți doar la tulpini ale aceluiași gen taxonomic) și **vectori shuttle** (navetă, suveică) - se replică stabil în, și pot fi folosiți în tulpini aparținând la două genuri microbiene, de exemplu: *Escherichia/Pseudomonas*, *Escherichia/Saccharomyces* etc.

3.1.1. VECTORI DE CLONARE PLASMIDIALI

Proprietățile plasmidelor ca vectori de clonare

Pentru a putea fi folosite ca vectori de clonare, plasmidele necesită o serie de caracteristici:

a) Să nu conțină gene *tra*, deci să nu genereze proces de conjugare bacteriană și, ca atare, să nu fie autotransmisibile. Această caracteristică este esențială atât, pentru diversele etape de cercetare, cât și pentru securitatea cercetătorului (foarte mulți vectori de clonare plasmidiali prezintă ca markeri de selecție gene de rezistență la antibiotice, iar dacă vectorii ar fi autotransferabili ar exista/crește riscul ca gene de antibioretistență să ajungă în diverse microorganisme patogene).

b) Să conțină situsuri unice pentru un număr cât mai mare de endonucleaze de restricție (la acest nivel se efectuează inserția ADN pasager).

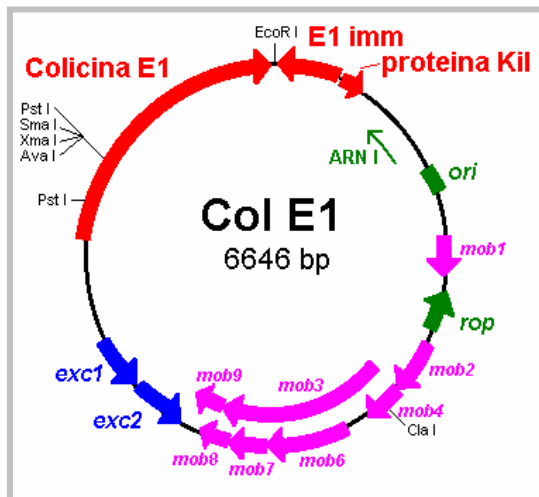
c) Situsul de inserție să nu fie localizat în genele implicate în replicarea și partiția plasmidului.

d) Să prezinte markeri genetici absenți în celula receptoare.

e) Să aibă o greutate moleculară mică, pentru a fi ușor de izolat și de manipulat.

f) Să prezinte cât mai multe copii per celulă.

Primul plasmid natural care a fost folosit în experimente de clonare genetică este plasmidul **Col E1** de la *Escherichia coli* (Fig.3.1.) Acest plasmid are o greutate moleculară de 4.6×10^6 Da, este neconjugativ, produce colicina E1 și conferă gazdei imunitate la această colicină. Selecția celulelor transformate (care au primit plasmidul) pe baza acestui marker (imunitatea la colicina) este o tehnică dificilă și, în final, reprezintă un dezavantaj al folosirii acestui plasmid în experimentele de clonare genetică. Pe de altă parte, plasmidul Col E1 poartă și gene **mob** care îi conferă capacitatea de transfer *in trans*, în prezența unui alt conjugon. Ca urmare, există riscul diseminării necontrolate a plasmidului Col E1 recombinat.



Ulterior, au fost folosite alte plasmide naturale - pSC101 și pRS2124 - care, datorită genei de rezistență la tetraciclină și, respectiv, rezistență la ampicilină, permit o selecție mai ușoară a transformanților.

În urma unor asemenea testări a plasmidelor naturale, s-a concluzionat că este necesară construcția unor plasmide artificiale, destinate exclusiv experimentelor de clonare.

În cele ce urmează vom prezenta câteva asemenea plasmide artificiale utilizate ca vectori de clonare.

Fig.3.1. Plasmidul Col E1.

Vectorul pBR322

Vectorul pBR322 (Fig.3.2.) este un vector plasmidial cu o lungime de 4361 bp (2.6×10^6 D). În construcția lui s-au folosit genele de replicare plasmidială din ColE1, fapt pentru care acest vector desfășoară o replicare pe același model cu ColE1: replicare realizată de ADN polimeraza I (și nu ADN polimeraza III, ca în cazul replicării cromosomului bacterian), în control relaxat, cu reglaj realizat de molecule de ARN antisens stabilizate de proteina Rop. Acest sistem prezintă avantajul că, atunci când tulpină gazdă este cultivată în prezență unei concentrații mari de cloramfenicol (170 $\mu\text{g/ml}$) - antibiotic ce inhibă întreaga proteosinteză din celula respectivă - replicarea cromosomului bacterian este blocată (întrucât necesită biosinteza continuă de ADN polimeraza III), dar se poate desfășura replicarea vectorului, proces realizat de ADN pol I (această enzimă este prezentă în mod continuu în celula în cantitate foarte mare). În acest mod, are loc de fapt o amplificare genetică prin creșterea numărului de copii plasmidiale per echivalent molar cromosomal.

Vectorul are 2 markeri genetici - 2 gene de rezistență la ampicilină și, respectiv, la tetraciclină, ce sunt transcrise în direcție inversă una de cealaltă.

Siturile de restricție importante pentru experimentele de clonare sunt:

- Pst I - în gena Ap^r
- Hind III, BamH I, Sal I - în gena Tc^r

Strategia de clonare în vectorul pBR322 și derivații săi (Fig.3.3.)

1 - Inserția ADN pasager – construcția vectorului recombinat

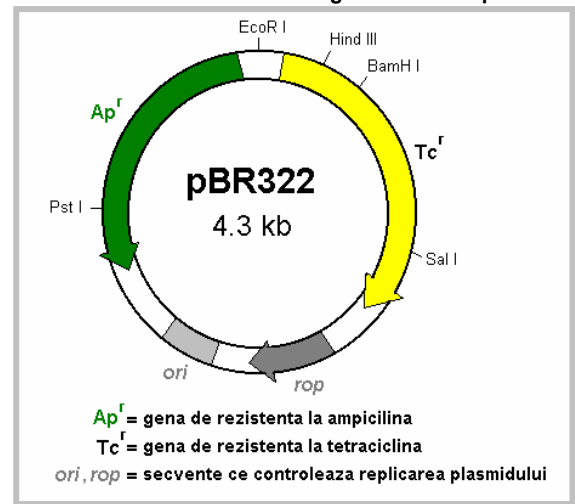
ADN pasager va fi inserat într-unul din situsurile de restricție din cele 2 gene de antibioretistentă (Ap^r , Tc^r) : (1) ambele molecule (vector și ADN pasager) se supun digestiei cu o aceeași enzimă de restricție, ceea ce va conduce la obținerea de capete complementare; (2) se amestecă cele 2 tipuri de molecule (în anumite proporții molare) astfel digerată (în prealabil, vectorul linearizat este tratat cu fosfatază alcalină pentru a evita recircularizarea lui); (3) se adaugă și o ADN ligază (de *E.coli* sau de T4, funcție de tipul de capete obținute - netede sau coezive) ce va reface legăturile fosfodiesterice rezultând **vectorul recombinat** .

În funcție de endonucleaza de restricție folosită la digestie, vectorul pBR322 recombinat va avea una din cele 2 gene de rezistență (Tc^r sau Ap^r) inactivă. Prin această inactivare inserțională pot fi deosebite moleculele de vector nerecombinat, fără ADN pasager ($\text{Ap}^r \text{Tc}^r$) de moleculele de vector recombinat, cu ADN pasager inserat ($\text{Ap}^r \text{Tc}^s$ sau $\text{Ap}^s \text{Tc}^r$).

2 - Propagarea vectorului recombinat în tulpini de *E.coli* și selecția celulelor transformate

Vectorul recombinat se introduce (prin tehnici de transformare genetică *in vitro*) într-o tulpină bacteriană ce trebuie să prezinte sensibilitate la ambele antibiotice ($\text{Ap}^s \text{Tc}^s$). Celulele transformate vor prezenta fenotip $\text{Ap}^r \text{Tc}^s$ sau $\text{Ap}^s \text{Tc}^r$.

Fig.3.2. Vectorul pBR322.



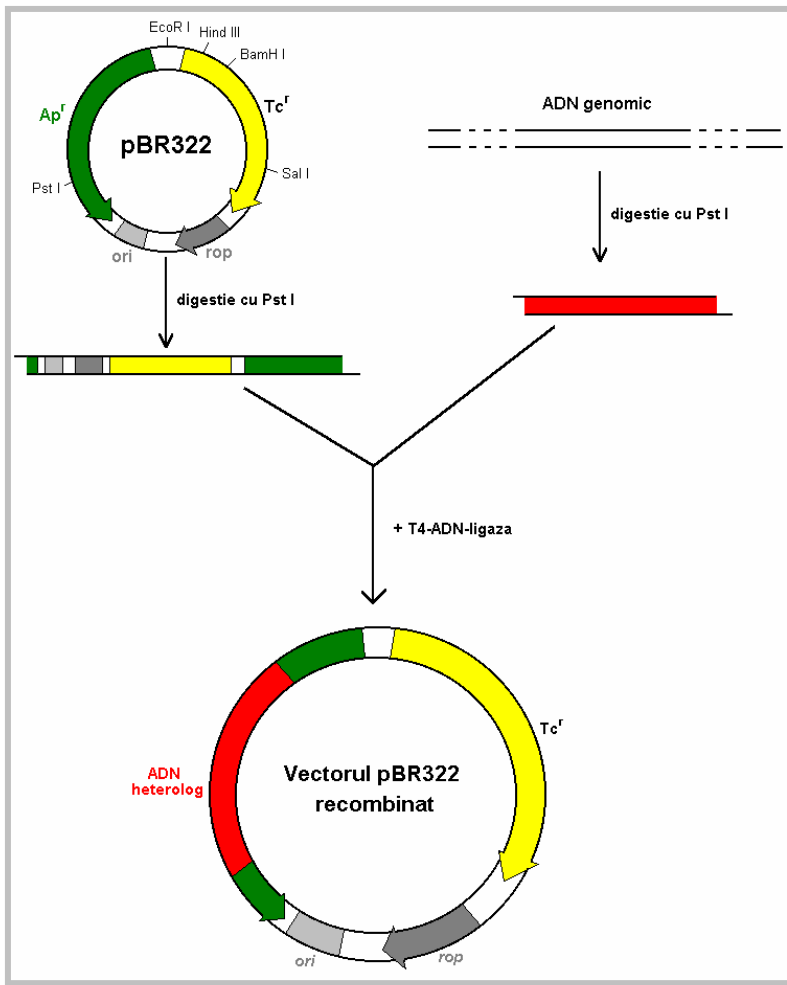


Fig.3.3. Schema clonării moleculare în vectorul pBR322.

În ultimii ani, principalele tendințe în construcția vectorilor plasmidiali sunt: (I) reducerea la maximum a dimensiunii vectorilor și mărirea capacității lor de a accepta ADN heterolog; (II) creșterea numărului de situsuri de restricție și distribuirea lor într-un cluster = **PolyCloning Site (PCS)**; (III) încorporarea în vectori a unor secvențe ce permit identificarea celulelor cu vectori recombinanți prin teste cât mai simple și mai rapide : **selecție directă** (sisteme ce permit numai creșterea clonelor recombinante) sau selecție prin **teste histochimice**; (IV) introducerea în vectori a unor secvențe ce permit generarea de molecule monocatenare necesare tehnicilor de secvențiere sau de construcție de sonde ADN; (V) introducerea în vectori a unor secvențe de tip promotori, terminatori, enhanceri, ce permit transcrierea *in vitro* a ADN clonat (pasager).

Vectorii pUC 18/19

pUC 18/19 (Fig.3.4.) sunt vectori doar de clonare, nepermițând și exprimarea ADN clonat. Au o dimensiune de 2.69 kb.

Acești vectori au regiunea *ori* din Col E1, cu diferența ca a fost scoasă gena *rop*. Ca atare, acești vectori sunt prezenți în mod obișnuit într-un număr foarte mare de copii per celulă și prezintă un potențial crescut de amplificare prin tratament cu cloramfenicol.

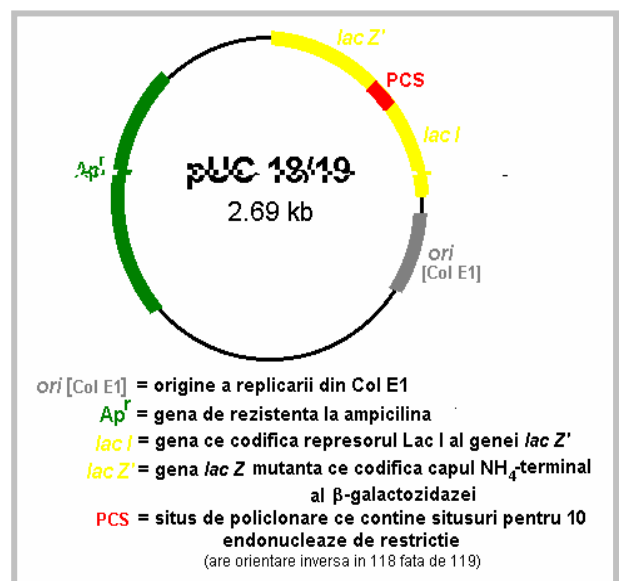
Acești vectori au 2 tipuri de markeri genetici:

gena **Ap^r** - caracter pe care se bazează selecția inițială (screeningul) a celulelor ce poartă vector;

gena **lacZ⁻** este o genă defectivă ce exprimă doar capătul NH₂-terminal al β-galactozidazei;

Această genă incompletă este capabilă de complementație intra-alelică cu o altă formă defectivă a genei *lacZ'* (ce codifică capătul COOH-terminal al β-galactozidazei) dintr-o gazdă bacteriană adecvată. În urma procesului de complementație, tulpina bacteriană defectivă dar purtătoare a vectorului nerecombinat este capabilă să refacă integral β-galactozidaza. Sub inducția **IPTG** (isopropil-tiō-β-D-galactosid, care este un inductor al genei *lacZ*), o asemenea tulpină formează colonii albastre pe un mediu ce conține **X-gal** (5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-galactosid).

Fig.3.4. Vectorul pUC 18/19.



Inserția unui ADN heterolog în situsul de policlonare (PCS, MCS) - care este inclus în promotorul lui *lacZ'* - determină imposibilitatea exprimării genei *lacZ'* și, ca atare, gena *lacZ* defectivă din cromosomul gazdei nu mai este complementată de cea din vectorul recombinat și, ca urmare, nu se mai formează β galactozidaza activă care să scindeze complexul X-gal cu formarea compusului indolic albastru. Coloniile ce poartă vectorul recombinat au culoarea albă. Este cea mai folosită variantă histochimică de selecție a clonelor recombinante.

Vectorii pUC18/19 reprezintă prima familie de vectori de clonare la care situsurile pentru endonucleazele de restricție au fost grupate într-o singură zonă a vectorului, denumită **situs de policlonare (PCS = PolyCloning Site ; MCS = MultiCloning Site)**. În pUC18/19, PCS conține situsuri pentru 10 endonucleaze de restricție și pentru 3 enzime izoschizomere. PCS este în orientare inversă în pUC19 față de pUC18.

Clonarea în acest situs determină tot o inactivare inserțională (o genă din vector nu se mai exprimă), diferență însă față de vectorii de clonare anteriori (pBR322, pBR325, pUB110) constând în posibilitatea identificării rapide, directe, a clonelor recombinante, pe baza diferenței de culoare dintre colonii (colonii albastre = celule ce poartă vector nerecombinat ; colonii albe = celule ce poartă vector recombinat).

Vectorii a căror derivați recombinanți se bazează pe acest sistem de identificare histochimică (complementația intra-alelică între 2 gene defective *lacZ*, una cromosomală și cealaltă pe vector), necesită a fi introduși în gazde bacteriene adecvate, care să aibe pe cromosom o genă *lacZ* defectivă ce codifică capul COO⁻ - terminal al β galactozidazei.

Strategia de clonare în vectorii pUC18/19 și derivații săi

a – Inserția ADN heterolog în situsul de policlonare se realizează prin aceleași etape ca și în cazul vectorilor anteriori: digestia vectorului și a ADN heterolog cu aceeași endonuclează de restricție (sau cu enzime izoschizomere), amestecarea fragmentelor și, respectiv, adăugarea unei ADN-ligaze;

b - Introducerea vectorului recombinat în tulpini bacteriene adecvate (au pe cromosom o gena *lacZ* defectivă ce completează gena *lacZ'* .

Selectarea clonelor celulare cu vector recombinat se realizează în 2 etape:

1 - cultivare pe mediu cu Ap și screeningul clonelor ce poartă vector (Ap^r)

2 - cultivarea acestor clone celulare pe mediu cu IPTG și X-gal și selecția coloniilor ce poartă vector recombinat (= colonii albe)

VECTORII pGEM

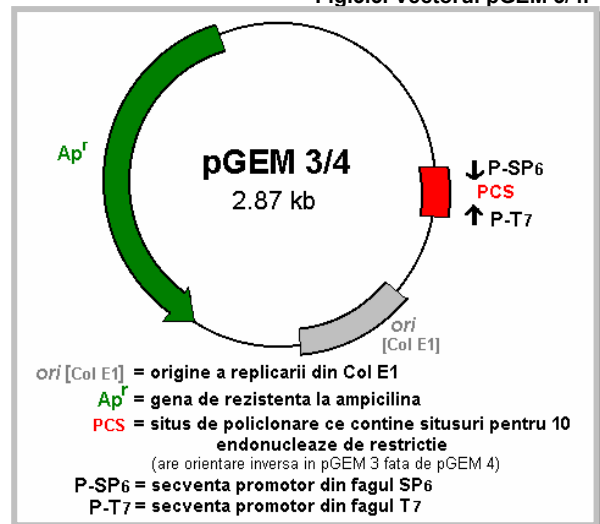
Vectorii pGEM (Fig.3.5., Fig.3.6.) sunt vectori plasmidiali de exprimare care conferă, deci, și posibilitatea analizei exprimării ADN heterolog. În structura lor intră următoarele regiuni:

- (1) regiunea *ori* din plasmidul Col E1, ce controlează replicarea vectorului;
- (2) Ap^r = gena de rezistență la ampicilină, pe baza căreia sunt selecționați transformanții;
- (3) regiunea **PCS** care conține situsuri pentru 10 endonucleaze de restricție + 3 enzime izoschizomere;
- (4) doi promotori, din fagii SP6 și T7, care flanchează regiunea PCS și care sunt în orientare inversă unul față de celălalt, permițând transcrierea ambelor catene ale ADN heterolog.

Vectorii **pGEM 3/4** (Fig.3.5.) au o dimensiune de

2.87 kb și diferă între ei prin orientarea situsurilor de restricție în cadrul regiunii PCS. Vectorii **pGEM 3Z/4Z** (Fig.3.6.) conțin în plus față de variantele 3/4 și o genă defectivă *lac Z'* identică cu cea din vectorii pUC 18/19, permițând deci selecția histochimică a clonelor recombinante.

Fig.3.5. Vectorul pGEM 3/4.



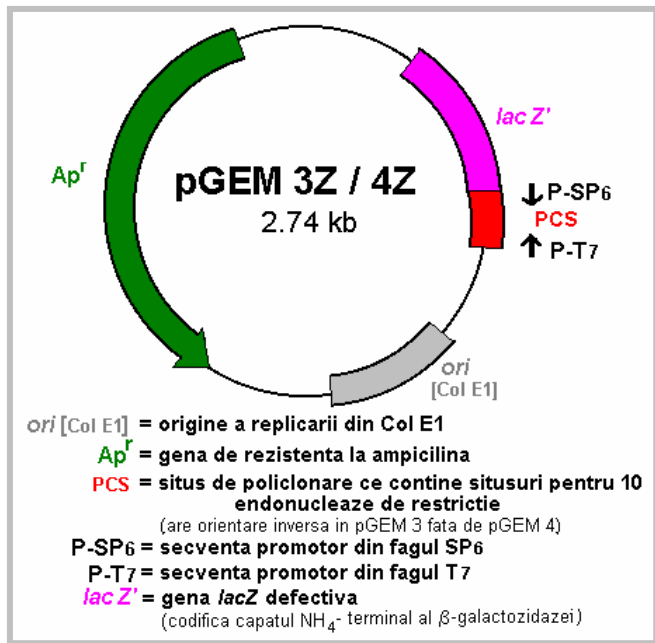


Fig.3.6. Vectorul pGEM 3Z/4Z.

3.1.2. VECTORI DERIVAȚI DIN FAGI FILAMENTOȘI

Fagii filamentoși (M13, f1, fd, Pf1) au genomul format dintr-o moleculă ADN m.c. circular închis, cu greutate moleculară medie de 2×10^6 D. După pătrunderea în celula bacteriană, ADN fagic inițiază ciclul de replicare cu ajutorul unei forme intermediare de replicare dublu catenare. Replicarea se face după modelul cercului rotativ și are ca rezultat formarea unui mare număr de catene ADN, notate prin convenție - catene "–" (catena infectantă este notată cu "+"). Aceste catene – vor servi ca matrice în transcrierea genelor fagice.

M13 este un fag filamentos specific pentru *Escherichia coli*. Are genom ADN m.c. (6.4 kb) cu omologie mare cu genomul fagilor f1 și fd. 90% din genom este reprezentat de gene ce codifică proteine. Aceste gene sunt separate între ele doar prin câteva nucleotide, singurele regiuni intergenice mai extinse sunt între genele VIII și III (IG 2), și respectiv, între II și IV (IG 1). Replicarea fagului M13 are loc pe modelul descris mai sus și este realizată de ADN polimeraza I a gazdei bacteriene. După sinteza catenei – (și, deci, formarea intermediarului dublu catenar de replicare), catena + este "nickată" și, în continuare, este sintetizată catena + pe matrice –. Ceea ce rezultă este o catenă + foarte mare, un concatemer format dintr-un mare număr de genomuri fagice. Ulterior, această moleculă va fi scindată în genomuri individuale.

Toate genele din fagii filamentosi sunt esențiale și, ca atare, vectorii derivați din acești fagi trebuie să prezinte toate genele fagilor sălbatici. Există totuși o regiune de 500 nucleotide, situată între genele II și IV, în care poate fi inserat ADN heterolog.

Vectorii din seria **mp** (dintre care cei mai folosiți sunt M13 mp 18/19 - 7.5 kb, Fig.3.7.) sunt derivați dintr-un fag M13 recombinant (M13 mp1), care are un mic fragment de ADN din vectorul pUC 18/19 inserat în principala regiune intergenica (**IG 1**). Acest fragment de ADN de *E.coli* cuprinde :

1. gena **lac I** = genă ce codifică represorul operonului *Lac*
2. gena **lac Z'** = gena *lac Z* defectivă, ce codifică capătul NH₄-terminal al βgalactozidazei
3. situsul **PCS** = situs de policlonaire

Aceste secvențe permit identificarea clonelor celulare infectate cu vector recombinat folosind același sistem histochimic, bazat pe complementația intra-alelica a celor 2 gene *lac Z* defective (una pe cromosom, cealaltă pe vector) și, respectiv, pe blocarea transcrierii de la promotorul *lac* prin inserția ADN heterolog.

Diferența între M13 mp 18 și varianta 19 constă în orientarea situsurilor de restricție în cadrul PCS.

În procesul de infectare a unei celule bacteriene de către un fag M13 este esențială etapa de interacțiune dintre fag și pilii de sex ai celulei bacteriene. Ca atare, în experimentele de introducere a unui vector M13 - derivat recombinat într-o tulpină bacteriană este necesară folosirea tulpinilor bacteriene F⁺, iar de regulă se folosesc tulpini F'. În afară de acest caracter, tulpinile bacteriene folosite trebuie să mai aibă următoarele caractere :

- (I) **lacZΔM15** = o genă *lac Z* mutantă în care a fost deletată regiunea ce codifică capul NH₄-terminal al βgalactozidazei. Astfel, secvența *lacZΔM15* codifică pentru capul COO -

terminal al β -galactozidazei și este capabilă să desfășoare o complementație cu gena *lac Z'* de pe vector, restaurând activitatea normală a acestei enzime.

- (II) $\Delta(lac-proAB)$ = deleția unui segment cromosomal ce include celelalte gene ale operonului Lac, precum și genele *proAB* implicate în biosinteza prolinei. Genele *proAB* există însă pe episomul F', complementând deleția cromosomală și asigurând menținerea episomului F' în celula respectivă.
- (III) *lac I^q* = o genă *lac I* mutantă ce sintetizează de aproximativ 10 ori mai mult represor Lac I decât forma salbatică, represând astfel și mai mult exprimarea operonului Lac, care este oricum la un nivel scăzut de transcriere în absența inductorilor. Și această genă este de regulă localizată pe episomul F'.
- (IV) *hsdR17* și *hsdR4* = mutații ce conduc la pierderea activității de restricție a ADN străin de celula respectivă, dar nu și a activității de modificare desfășurată de sistemele enzimatică de restricție/modificare de tip I. Astfel, ADN heterolog nemodificat (nemetilat) clonat direct în vectori derivați din fagul M13 și propagat în tulpini bacteriene ce poartă asemenea mutații va fi modificat (metilat) de către enzimele gazdei și, deci, protejat împotriva proceselor de restricție în cazul clonărilor ulterioare în alte tulpini *hsd⁺*.

Câteva exemple de asemenea tulpini bacteriene sunt: *E.coli* JM 105, 107, 109, 110, XL1-Blue.

Strategia de clonare în vectorii M13 mp 18/19

În experimentele de clonare în acești vectori, de regulă, un fragment de ADN heterolog este clonat în ambele variante: și M13 mp 18, și M13 mp 19.

1- Inserția ADN heterolog în vector

- forma replicativă (RF), dublu-catenară, a vectorilor M13, mp 18 și 19, se supune digestiei cu 2 endonucleaze de restricție; vectorii astfel linearizați nu se pot recirculariza decât cu capete compatibile cu cele ale ADN heterolog.

- ADN heterolog se supune și el digestiei succesive cu aceleași 2 enzime de restricție;

- ADN heterolog se amestecă separat cu fiecare din cei 2 vectori linearizați și se adaugă o ADN-ligaza; Rezultă 2 tipuri de vectori recombinanți, care au ADN heterolog inserat în orientări opuse.

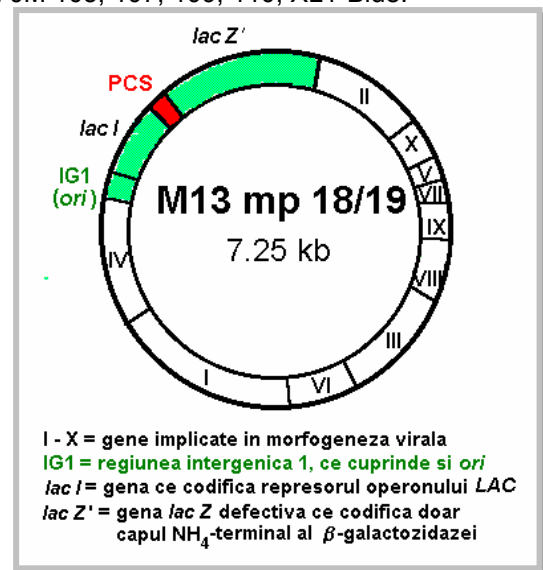


Fig.3.7. Vectorul M13 mp 18/19.

3.1.3. VECTORI DE CLONARE HIBRIZI DE TIP FAGIMIDE

Fagimidele sunt vectori hibridi ce combină caractere de plasmide cu caractere de fagi filamentoși.

Caracterele de plasmide: au o origine a replicării din ColE1, segment ce asigură replicarea de tip cerc rotativ și menținerea vectorului în forma plasmidială; au o genă de rezistență la antibiotic, caracter selectabil în tulpinile bacteriene ce poartă acest vector.

Caractere de fag filamentos: au regiunea intergenică majoră (IG 1) dintr-un fag filamentos. Această regiune conține toate secvențele necesare *in cis* pentru întreaga replicare a vectorului pe modelul replicării fagilor filamentosi și pentru morfogeneza particulelor virale.

Datorită acestor caractere duale, fagimidele pot fi propagate și menținute în forma plasmidială în tulpină bacteriană gazdă atunci când aceasta este cultivată în condiții obișnuite, standard. Când celulele gazdă sunt infectate cu un **fag filamentos helper**, atunci modul de replicare a vectorului se schimbă sub acțiunea produsului genei *II* (endonucleaza II) codificat de virusul helper. Acest produs interacționează cu regiunea intergenică din vector, inițiind replicarea pe modelul fagilor filamentoși și generând astfel monocatene ADN ce vor fi apoi clivate, circularizate și împachetate în particule fagice. ADN m.c. purificat din aceste particule în experimente de secvențiere sau pentru obținerea de sonde ADN m.c.

Actualmente se folosesc ca virusuri helper în asemenea experimente, virusuri cu genom modificat prin manipulări genetice (de exemplu, M13 K07), astfel încât nu pot genera propriile particule fagice și au gena II mutantă ce acționează mai bine pe IG din fagimid decât pe IG propriu.

Cei mai reprezentativi vectori de clonare de tip fagimide sunt pUC 118/119 și pBluescript.

Vectorii pUC 118/119

Acești vectori (Fig.3.8.) au o dimensiune de 3.2 kb și sunt, de fapt, vectori hibridi din categoria fagimidelor. **Fagimidele** sunt vectori hibridi ce au 2 origini de replicare: una (*ori-Col E1*) care generează replicare de tip plasmidial (de regulă, mecanismul "rolling circle") și una (dintr-un fag filamentos, *ori-M13* sau *f1*) care generează replicare de tip fag filamentos, adică generează monocatene. Monocatenenele sunt ulterior folosite în experimentele de secvențiere ADN, sau ca sonde ADN m.c.

ADN clonat în fagii filamentoși s-a dovedit a fi instabil în timp (cu cât este mai mare fragmentul, cu atât mai instabil), suferind deleții și rearanjamente. Astfel, avantajul major al fagimidelor îl reprezintă posibilitatea păstrării ADN heterolog inclus într-un ADN circular și, ca atare, ADN clonat este mult mai stabil (nu apar deleții, rearanjamente). Pe de altă parte, pUC 118/119 pot accepta ADN heterolog mult mai mare decât pUC 18/19.

Ca și pUC 18/19, varianta 118/119 au *ori-Col E1* fără gena *rop*. Poartă gena *Ap^r* pentru screeningul clonelor transformate și gena *lacZ'* pentru selecția histochimică a clonelor recombinat.

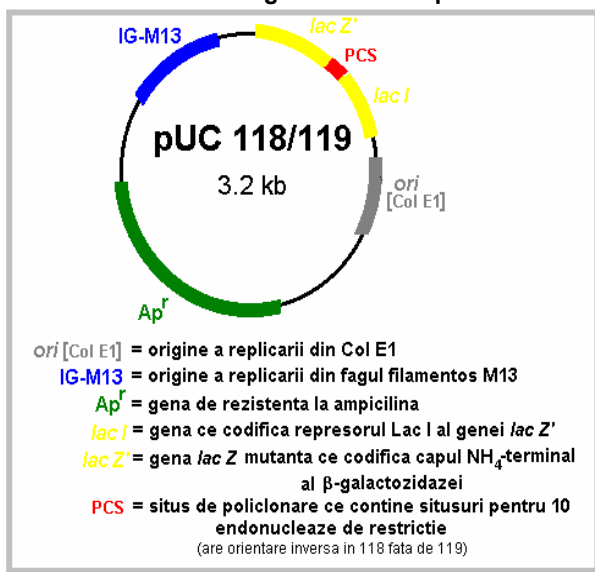
Situsul PCS este inclus în promotorul genei *lacZ'* (P_{lac}) și, ca urmare, clonarea va bloca transcrierea genei *lacZ'*.

Strategia de clonare în vectorii pUC 118/119

a - Inserția ADN heterolog în vector se realizează după aceleași etape ca și la vectorii anterior prezentați.

c - Introducerea vectorului recombinat în celule bacteriene se efectuează tot prin tehnici de transformare genetică microbiană. Screeningul și selecția clonelor recombinat se efectuează în același mod ca și în cazul vectorilor pUC 18/19.

Fig.3.8. Vectorul pUC 118/119.



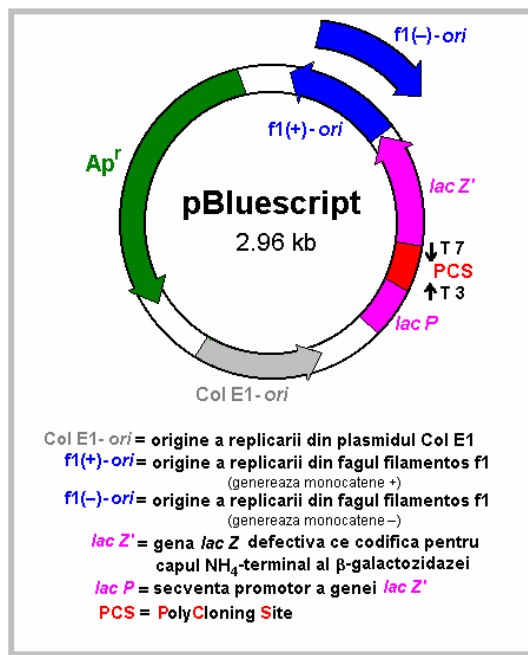
Vectorul pBluescript

Vectorii din seria pBluescript (Fig.3.9.) sunt vectori de tip fagimide, multifuncționali, construiți pentru a simplifica clonarea moleculară și analiza genetică. Asemenea vectori oferă următoarele avantaje în experimentele de clonare : clonare multiplă în PCS (Tab.3.1); selecție histochimică a clonelor recombinat (colonii albe); transcriere *in vitro* a ADN heterolog, mediată de promotorii T3 și T7; obținere de monocatene ADN; exprimarea de proteine de fuziune (cu βgalactozidază)

1. Replicarea vectorului

pBluescript (Fig.3.9.) are 2 origini de replicare: una din plasmidul Col E1 (de la *Escherichia coli*) și cealaltă din fagul filamentos *f1*. Originea din Col E1 controlează replicarea vectorului prin mecanismul cercului rotativ și, deci, permite menținerea vectorului sub forma de molecule ADN d.c. circular covalent închis (CCC). Originea din fagul *f1* este activată *in trans* de proteine codificate de genomul unui alt fag (M13), introdus ca fag helper, cu genom modificat, astfel încât acesta nu se poate replica.

Fig.3.9. Vectorul pBluescript.



2. Situsul PCS

Regiunea de policlonare din pBluescript conține situsuri pentru 20 de endonucleaze de restricție: Sac I, Bst XI, Sac II, Not I, Eag I, Xba I, Spe I, BamH I, Sma I, Pst I, EcoR I, EcoR V, Hind III, Cla I, Sal I, Acc I, Hinc II, Xho I, Apa I, Dra II, Kpn I, oferind astfel un set foarte bogat de enzime pentru clonare.

Există diverse variante de vectori pBluescript - SK, KS – funcție de orientarea situsurilor de restricție (Sac I → Kpn I sau Kpn I → Sac I).

Regiunea este încadrată de promotorii T3 și T7 și întreg acest complex este flancat de câte un situs pentru endonucleaza de restricție BssH II (situs extrem de rar în genomuri), cu ajutorul căreia poate fi, deci, excizat.

3. Transcriere *in vitro* (Fig.3.10.)

Situsul de policlonare este încadrat de promotorii T3 și T7 care permit desfășurarea unui proces de transcriere *in vitro*. Din multitudinea de promotori disponibili la bacterii și bacteriofagi au fost aleși acești 2 promotori din fagii T3 și, respectiv, T7, datorită faptului că ei sunt recunoscuți foarte specific de ARN polimerază cognată, astfel încât se elimină riscul ca aceasta enzimă să desfășoare proces de transcriere de la alt promotor.

Acești 2 promotori se găsesc în orientare inversă unul față de celălalt și, ca atare, ADN heterolog clonat poate fi transcris pe oricare din cele 2 catene, funcție de orientarea pe care o are în molecula de vector recombinat.

Procesul de transcriere *in vitro* permite obținerea de molecule ARN ce pot fi apoi folosite ca sonde moleculare în experimente de hibridizare moleculară.

Pe de altă parte, după transcriere *in vitro* poate fi realizat și un proces de traducere *in vitro*, ceea ce conduce la obținerea de proteine care pot fi ulterior analizate.

4. Obținerea de monocatene ADN (Fig.3.11.)

După clonarea în PCS, vectorul recombinat (care se află în formă CCC) se introduce, prin transformare genetică, în celule bacteriene. Pentru a obține monocatene, tulpină bacteriană în care se află deja vectorul recombinat, se infectează cu un fag M13 defectiv (**M13 K07**) care are gena II mutantă, astfel încât produsul ei va acționa preferențial asupra secvenței *ori-f1* din fagimid, declanșând replicarea ADN pe modelul fagilor filamentoși și, deci, obținerea de monocatene. În funcție de orientarea regiunii *ori-f1* în fagimid (f1+ sau f1-) monocatena va conține catena sens sau cea antisens a genei *lac Z*.

Pentru a putea infecta gazdă bacteriană cu un fag M13 este necesar ca tulpină bacteriană folosită să aibă un plasmid F integrat în cromosom, astfel încât să prezinte pe suprafața celulară pili de sex. Procesul de infectare a unei gazde bacteriene de către un fag filamentos presupune ca etapa inițială atașarea fagului la pilii de sex ai celulei.

pBluescript II KS	pBluescript II SK	pBluescript I SK
BssH II	BssH II	
T7	T7	T7
Sac I	Kpn I	Kpn I
Bst XI / Sac II	Dra II	Dra II
Not I / Eag I	Apa I	Apa I
Xba I	Xho I	Xho I
Spe I	Sal I / Acc I / Hinc II	Sal I / Acc I / Hinc II
BamH I	Cla I	Cla I
Sma I	Hind III	Hind III
Pst I	EcoR V	EcoR V
EcoR I	EcoR I	EcoR I
EcoR V	Pst I	Pst I
Hind III	Sma I	Sma I
Cla I	BamH I	BamH I
Sal I / Acc I / Hinc III	Spe I	Spe I
Xho I	Xba I	Xba I
Apa I	Not I / Eag I	Not I / Eag I
Dra II	Bst XI / Sac II	Bst XI / Sac II
Kpn I	Sac I	Sac I
T3	T3	T3
BssH II	BssH II	

Tab.3.1. Componența în situsuri de restricție a regiunii PCS în 3 variante ale fagimidului pBluescript.

5. Obținerea de proteine de fuziune

Pentru obținerea unei cantități suficiente din proteina heterologă, sub o formă moleculară neatacabilă de către proteazele celulare, se poate realiza un proces de transcriere și traducere *in vitro* pornind de la promotorul *lac*. ADN heterolog fiind clonat în PCS, deci, în interiorul lui LacP, în urma traducerii se va obține o proteină de fuziune - proteina heterologă plus β-galactozidaza.

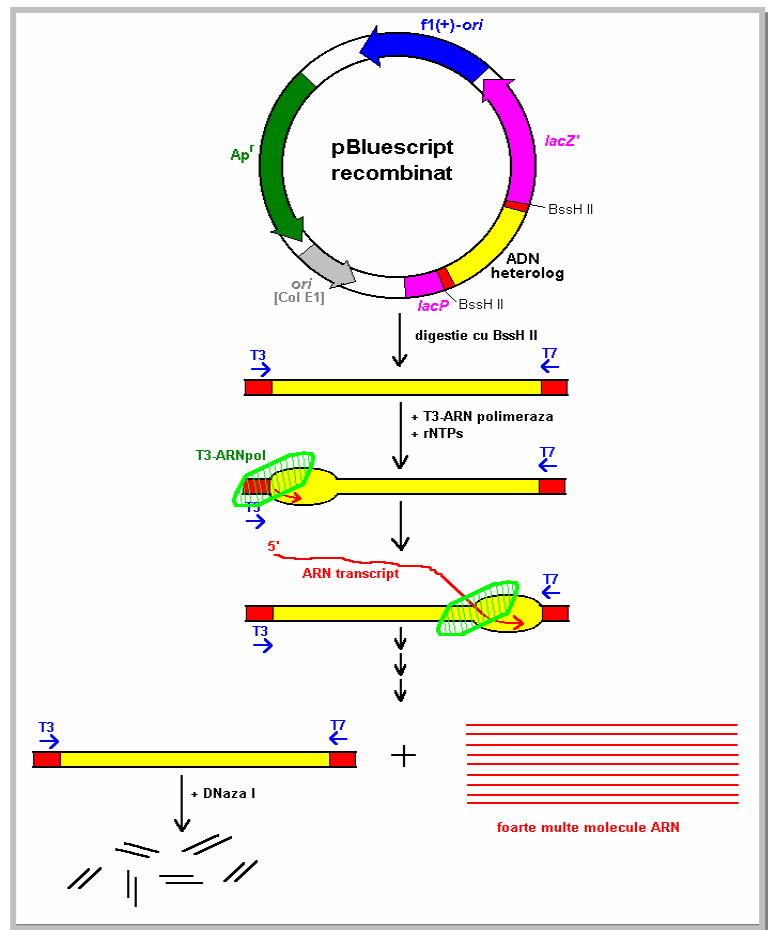


Fig.3.10. Obținerea de molecule ARN prin proces de transcriere *in vitro* a unui fragment de ADN heterolog clonat în fagimidul pBluescript.

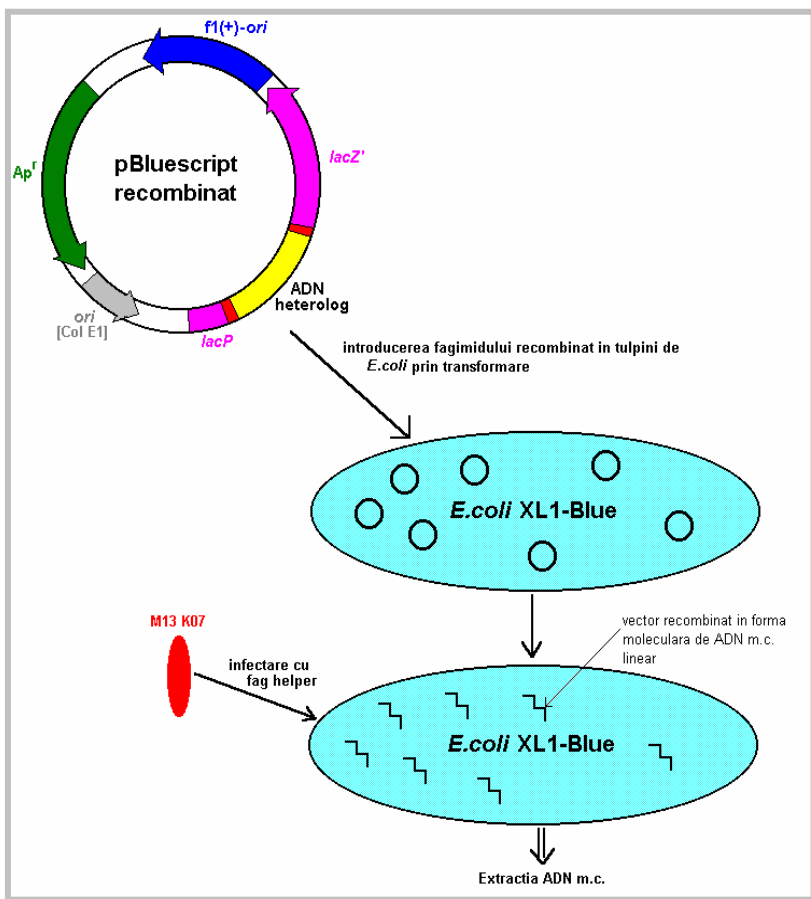


Fig.3.11. Obținerea de monocatene ale ADN heterolog clonat în fagimidul pBluescript.

3.1.4. VECTORI DERIVAȚI DIN GENOMUL BACTERIOFAGULUI λ

De când a fost folosit pentru prima dată ca vector de clonare (Murray și Murray 1974), bacteriofagul λ (se citește *lambda*) a ocupat un rol central în experimentele de clonare. Pe baza analizelor de genetică și fiziologie a acestui virus, în prezent, au fost construiți și sunt comercializați o serie de vectori suficient de sofisticati.

Genomul fagului λ , prezentînd dimensiuni mari, nu poate fi utilizat ca atare ca vector de clonare. Cu atît mai mult cu cît ADN-ul său conține multe situsuri pentru enzime de restricție în gene esențiale pentru ciclul litic al fagului. Pe de alta parte, particulele fagice nu pot prelua o cantitate mult mai mare de ADN decît propriul genom.

Totuși, toate aceste impedimente au fost depășite :

1. regiunea centrală a genomului viral (ce reprezintă aproximativ 1/3 din genom) nu este esențială pentru creșterea litică și, ca atare, poate fi înlocuită de ADN heterolog; această regiune a fost denumită "**stuffer**"
2. prin manipulare genetică situsurile de restricție au fost eliminate din regiunile esențiale
3. mai mult decît atît, folosind oligonucleotide sintetice, situsurile de restricție au fost plasate exact în pozițiile cele mai favorabile

Toate aceste metode au condus la dezvoltarea unui mare număr de vectori ce pot accepta și propaga fragmente de ADN heterolog, folosind un set foarte larg de enzime de restricție.

În funcție de tehnica de inserare a ADN heterolog, vectorii derivați din fagul λ se clasifică în :

a) vectori inserționali - se caracterizează prin faptul că prezintă un unic situs pentru o anumită endonuclează de restricție, situs la nivelul căruia se insera ADN heterolog, fără a înlocui vreo regiune din vector;

b) vectori de substituție (înlocuire) – prezintă 2 situsuri pentru o aceeași endonuclează de restricție, cele 2 situsuri flancînd o regiune neesențială a vectorului (regiunea "*stuffer*"); aceasta regiune va fi înlocuită cu ADN heterolog, generînd vectorul recombinat.

Alegerea vectorului λ adecvat

Nici unul din vectorii derivați din fagul λ nu sunt adecvați pentru toate experimentele de clonare moleculară. Ca urmare, este necesară alegerea vectorului cel mai adecvat scopului urmărit și, în consecință trebuie luați în considerare 3 factori:

2. enzima (sau enzimele de restricție) ce vor fi folosite;
3. dimensiunea fragmentului de ADN heterolog ce urmează a fi clonat;
4. dacă vectorul va fi folosit și pentru exprimarea ADN heterolog în *E.coli*.

Construcția de vectori ce conțin situsuri multiple de clonare a simplificat foarte mult mecanismele de clonare moleculară în vectori derivați din fagul λ . Totuși, dimensiunea insertului rămîne încă un factor important de luat în considerare. Aproape 60% din genomul viral (brațul stîng - 20 kb – incluzînd genele capsidului și genele cozii - de la **A** pîna la **J** și brațul drept - 8-10 kb - de la **P_R** pîna la **cos**) este necesar pentru ciclul litic al fagului λ . Deci, treimea centrală a genomului viral poate fi înlocuită de ADN heterolog. Cu toate acestea, viabilitatea bacteriofagului descrește simțitor atunci cînd dimensiunea totală a genomului este în afara limitelor de 78-105% față de fagul λ sălbatic.

Sisteme de selecție a vectorilor λ -derivați recombinanți

1) folosirea unor sisteme genetice ce se găsesc în regiunea de înlocuit ("*stuffer*"). De exemplu, există vectori derivați din λ și care poartă în regiunea *stuffer* o gena **lac Z** (ce codifică pentru β -galactozidază). Atunci cînd sunt introduși în gazde bacteriene *lac⁻*, iar acestea cultivate în prezența substratului cromogen X-gal, formează plaje de liza de culoare albastru închis. Introducerea în acești vectori de substituție a unui fragment de ADN heterolog, conduce la eliminarea genei *lac Z* și, ca urmare, vectorii recombinanți vor forma plaje de liza incolore.

2) în cazul vectorilor de inserție - de exemplu, λ gt10 - care conține un unic situs pentru EcoRI localizat în gena *cl*, se recomandă folosirea unei tulpini de *Escherichia coli* mutantă - care are o mutație **hfl** (high frequency of lysogenisation). În asemenea mutante, produsul genei fagice *cII* se acumulează în cantități foarte mari, acest produs fiind de fapt un reglator pozitiv al genei *cl*, care, la rîndul ei, determină represia ciclului litic și intrarea în ciclul lizogen. Ca urmare, vectorii nerecombinanți vor intra automat în ciclul lizogen și, deci, nu vor produce plaje de liză.

Introducerea ADN heterolog prin inserție la situsul Eco RI din gena *cl* va inactiva această genă și, ca urmare, toate genomurile fagice recombinante vor intra în ciclul litic. Această metodă este extrem de folositoare pentru screeningul unor banchi de gene clonate în vectorul λ gt10.

3) un alt tip de selecție se bazează pe faptul ca multiplicarea fagului λ sălbatic este restricțată în gazde ce poartă profagul **P2**. Acest fenotip este denumit **Spi⁺** (sensibil la interferența cu P2). Totuși, tulpinile de fag λ ce nu au genele implicate în recombinare (**red** și **gam**) pot crește bine în gazde lizogene pentru P2 și prezintă, deci, fenotip **Spi⁻**.

Pe baza acestor constatări au fost construiți o serie de vectori derivați din λ (λ **DASH**, λ **EMBL**) care au genele **red** și/sau **gam** în regiunea "stuffer". Înlocuirea acestei regiuni cu un ADN heterolog conduce la obținerea de vectori recombinati ce prezintă fenotip **Spi⁻** și care, deci, cresc eficient în tulpini de *E.coli* lizogene pentru P2.

4) în anumite condiții, menținerea genelor **red** și/sau **gam** în vectorii fagici recombinati prezintă o serie de avantaje. Produsul genei **red** este implicat în evenimentele de recombinare timpurii din timpul ciclului litic, evenimente ce "resolva" ADN viral replicativ (de forma theta) în molecule CCC. Ulterior, aceste molecule devin matrice pentru replicarea de tip cerc rotativ, formându-se oligomeri lineari ai ADN viral ce vor fi împachetați în particulele fagice mature.

Produsul genei **gam** inactivează **exonucleaza V** a gazdei codificată de genele **recB** și **recC** ale gazdei bacteriene. În absența produsului genei **gam**, exonucleaza V (**RecBC**) degradează moleculele lineare concatenate ale ADN viral produse prin replicare de tip cerc rotativ. Astfel, într-o bacterie infectată cu un fag **gam⁻**, există foarte puține molecule virale disponibile pentru împachetare. Ca urmare, fagii **red⁻** și **gam⁻** trebuie propagați în gazde **recA⁺** (RecA este proteină majoră a recombinării în *Escherichia coli*).

5) Un ultim factor genetic ce trebuie luat în considerare în alegerea unui vector derivat din fagul λ este prezența situsului **chi**. Bacteriofagul λ sălbatic nu conține nici un situs **chi**. Situsurile **chi** sunt situsurile preferate pentru recombinarea mediată de enzima **RecBC** a gazdei. Mutantele λ ce poartă o secvență **chi** octanucleotidică supresează fenotipul **Spi⁻** ce apare în mod normal la fagii **red⁻ gam⁻** în tulpini sălbatice de *E.coli*. Această supresie poate fi explicată prin faptul că, în prezența situsurilor **chi**, procesul de recombinare ce dă naștere la molecule virale împachetabile este crescut, astfel încât plajele de liză formate sunt aproape la fel de mari ca și în cazul fagilor **red⁺ gam⁺**.

Majoritatea vectorilor λ au aceste 2 gene (**red** și **gam**) în regiunea "stuffer", astfel încât atunci când în vector este introdus ADN heterolog, vectorii recombinati prezintă fenotip **red⁻ gam⁻**. Totuși, ADN heterolog eucariot conține foarte frecvent secvențe ce mimează situsuri **chi** și, ca urmare, vectorii recombinati vor avea fenotip **Spi⁺** și, deci, nu vor putea fi selectați pe baza acestui sistem genetic. Astfel de vectori se recomandă a fi propagați în gazde **recBC⁻** pentru a putea fi selectați prin sistemul **Spi⁻/Spi⁺**.

Mai recent au fost construiți și vectori λ care permit nu numai clonare și propagarea ADN heterolog, dar și exprimarea acestuia în gazde bacteriene (de exemplu, λ **gt11**).

Vectorii λ CHARON

Vectorii λ Charon sunt vectori de clonare (nu și de exprimare). Ei sunt în general folosiți ca vectori de înlocuire, dar prezintă și situsuri unice pentru endonucleaze de restricție, fapt ce permite și clonarea unui ADN heterolog prin mecanisme de inserție. În seria vectorilor Charon, de la Charon 3A până la Charon 40, crește dimensiunea ADN heterolog ce poate fi clonat.

Acești vectori sunt folosiți cu precădere ca vectori suport pentru băncile de gene.

Vectorul CHARON 4A

Vectorul Charon 4A permite clonare atât prin substituție, cât și prin inserție, dar de regulă este folosit ca vector de substituție pentru bănci genomice ale ADN eucariot. Dimensiunea acestui vector este de 45.4 kb și acceptă ADN heterolog de 0-6 kb (în clonarea prin inserție) sau de 7-20 kb (în clonarea prin substituție). În regiunea centrală, neesențială, acest vector poartă o gena **lac Z**, ceea ce permite identificarea recombinanților de inserție prin fenotip Lac⁺, și o gena **bio**, ceea ce permite creșterea gazdelor bio-.

Caracteristici genetice

Substituție	<i>lac5, bio256, QSR80</i>
Inserție	Da
Statusul <i>red/gam</i> al vectorului	<i>red⁻ gam⁻</i>
Statusul <i>red/gam</i> al recombinanților	<i>red⁻ gam⁻</i>
Situs chi în recombinanți	probabil
Propagare în gazde <i>recA⁻</i>	Nu
Selecție Spi	Nu

Situsuri de clonare

Situs	Inserție/ Substituție	Dimensiune (kb)			Fenotipul recombinanților
		Brațul stâng	insertul	bratul drept	
EcoRI	Substituție	19.5	7-20	11.0	Lac ⁻ Bio ⁻
XbaI	inserție	24.8	0-6	20.5	Lac ⁺ Bio ⁺

Vectorul CHARON 40

Fig.3.12. Vectorul Charon 40.

Acest vector (Fig.3.12.) este numai vector de înlocuire, întru-cât nici unul din situsurile de restricție nu este unic. Prezintă 2 situsuri de policlonare (PCS) ce conțin câte 16 situsuri de restricție. Cei 2 PCS se află în orientare inversă.

Regiunea "stuffer" (POLYSTUFFER) are o secvență unică pentru Charon

40 și conține o secvență repetată de aproximativ 80 de ori. Această secvență cuprinde operatorul *lac* și un fragment de ADN de adenovirus. Fiecare unitate de repetare are un situs pentru endonuclează de restricție *Nae* I. Prin digestie cu această enzimă, regiunea polystuffer este digerată în multe fragmente mici ce pot fi îndepărtate prin precipitare cu PEG (polietilenglicol). Această structură a stuffer-ului permite o foarte bună îndepărtare a regiunii de înlocuit.

Vectorul Charon 40 poate accepta fragmente de ADN heterolog cu dimensiuni cuprinse între 9.2 și 24.2 kb.

Acest vector are gena *gam*⁺ în brațul stâng și nu în regiunea de înlocuit, astfel încât atât vectorul nerecombinat, cât și cel recombinat se pot propaga în tulpini de *E.coli recA*⁻.

Caracteristici genetice

Substituție	regiunea polystuffer
Inserție	Nu
Statusul <i>red/gam</i> al vectorului	<i>red</i> ⁻ <i>gam</i> ⁺
Statusul <i>red/gam</i> al recombinanților	<i>red</i> ⁻ <i>gam</i> ⁺
Situs <i>chi</i> în recombinanți	Absent
Propagare în gazde <i>recA</i> ⁻	Da
Selecție Spi	nu

Situsuri de clonare

Situs	Inserție/ Substituție	Dimensiunea (kb)			Fentipul recombinanților
		Brațul stâng	insert	Brațul drept	
EcoRI, Apal, Xbal, Sfil, SacI, AvriI, Sall, SpeI, HindIII, XhoI, BamHI, NaeI, KpnI, NotI, SmaI, XmaII	substituție	19.2	9.2-24.2	9.6	Majoritatea plajelor sunt recombinante. Regiunea stuffer este îndepărtată eficient

Strategia de clonare în Charon 40

1) Inserarea ADN heterolog în vector

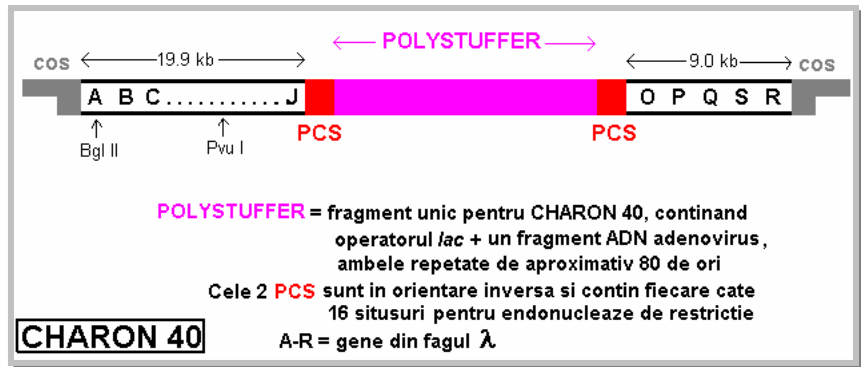
- atât vectorul cât și ADN heterolog se supun digestiei cu o aceeași endonuclează de restricție
- vectorul digerat se supune în continuare unei digestii cu endonucleaza de restricție *Nae* I ce va cliva regiunea polystuffer în fragmente mici; aceste fragmente sunt apoi îndepărtate prin precipitare cu PEG
- vectorul astfel tratat se amestecă cu ADN heterolog și se adaugă o ADN-ligază ⇒ vector recombinat

2) Introducerea vectorului recombinat într-o tulpină bacteriană

- se recomandă o tulpină *recA*⁻ de *Escherichia coli* F⁺
- pentru infectare se amestecă suspensia bacteriană cu vectorul recombinat și se incubează timp variabil la 37°C (de fapt, este vorba de un amestec ce conține atât molecule recombinante, cât și molecule nerecombinante)

3) Selecția moleculelor de vector recombinat

- după infectare, suspensia bacteriana se amestecă cu agar moale și se toarnă ca strat în placi Petri cu mediu adecvat
- după incubare, se aspiră cu o micropipetă stratul de agar moale corespunzător unei plaje de liză mari (de altfel, majoritatea plajelor formate sunt determinate de fagi recombinanți); ulterior, particulele fagice se purifică din acest agar moale.



VECTORII λ EMBL

Sunt vectori de clonare, de înlocuire, ce pot integra ADN heterolog de până la 20 kb. Regiunea stuffer este încadrată de 2 situsuri de policlonare (PCS) ce conțin câte 3 situsuri de restricție și sunt în orientare inversă. De exemplu, la λEMBL 4 această zona are următoare structură :

EcoRI , BamHI , Sall - STUFFER - Sall , BamHI , EcoRI

Vectorii din seria EMBL sunt foarte utili pentru clonarea fragmentelor de digestie parțială cu endonucleaza de restricție Sau3AI, datorită faptului că în vector situsul BamHI este flancat de EcoRI și Sall și, ca urmare, fragmentele clonate pot fi excizate din recombinanți prin digestie cu EcoRI sau cu Sall.

În regiunea stuffer, vectorii EMBL au genele **red** și **gam** și, deci, prezintă fenotip **Spi⁺** atunci când infectează tulpini bacteriene lizogene pentru bacteriofagul P2. Recombinații au fenotip **Spi⁻** și astfel pot fi selectați pe gazde lizogene cu profag P2.

Vectorul λEMBL 4 (Fig.3.13.)

Caracteristici genetice

Substituție	<i>red, gam trpE</i>
Insertie	Nu
Statusul <i>red/gam</i> al vectorului	<i>red⁺ gam⁺</i>
Statusul <i>red/gam</i> al recombinanților	<i>red⁻ gam⁻</i>
Situs <i>chi</i> prezent în recombinanți	Probabil
Selecție <i>Spi</i>	Da

Situsuri de clonare

Situs	Dimensiune (kb)			Fenotipul recombinanților
	Insertie/ Substituție	Brațul stâng	Brațul drept	
Sall BamHI EcoRI	substituție	19.9	7-20	Spi ⁻

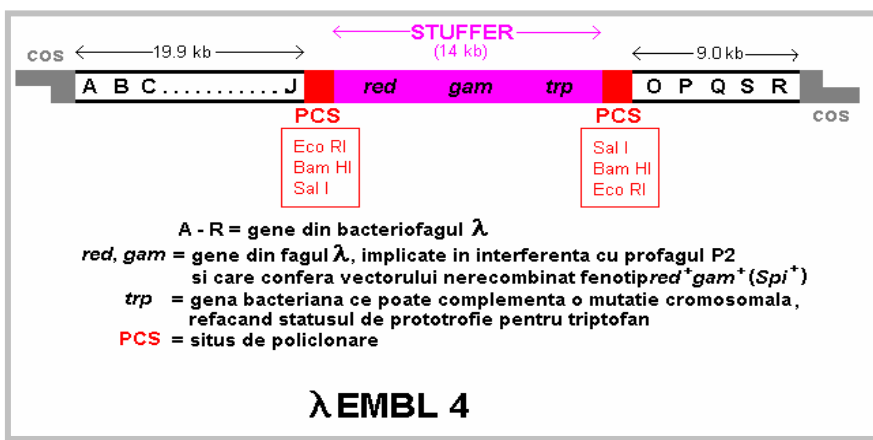


Fig.3.13. Vectorul λEMBL 4

VECTORII λgt

Vectorii din seria λgt sunt vectori de clonare și/sau exprimare folosiți pentru clonarea unor fragmente mici de ADN (6 kb) într-un situs unic pentru endonucleaza de restricție EcoRI, situs localizat în regiunea de imunitate (**imm**). Ca atare, acești vectori sunt vectori inserționali.

Datorită localizării situsului de inserție în regiunea de imunitate, vectorii nerecombinanți au fenotip **cl⁺** și, deci, lizogenizează în tulpini bacteriene *hfl*. Vectorii recombinanți au fenotip **cl⁻** și, ca urmare, în bacterii *hfl* intră în ciclul litic și formează plaje de liză, putând astfel să fie selectați prin acest sistem.

Vectorul λgt10 (Fig.3.14.)

Caracteristici genetice

Substituție	da (regiunea <i>imm</i>)
Insertie	nu
Statusul <i>red/gam</i> al vectorului	<i>red⁺ gam⁺</i>
Statusul <i>red/gam</i> al recombinanților	<i>red⁺ gam⁺</i>
Situs <i>chi</i> prezent în recombinanți	nu
Propagare în gazde <i>recA⁻</i>	da
Selecție <i>Spi</i>	nu

Situsuri de clonare

Situs	Insertie/ Substituție	Dimensiunea (kb)			Fenotipul recombinanților
		Brațul stâng	insert	Brațul drept	
EcoRI	insertie	32.7	0-6	10.6	cl ⁻

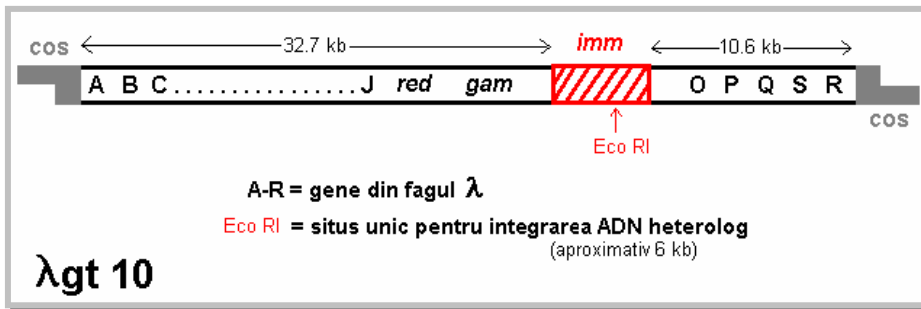


Fig.3.14. Vectorul λ gt 10.

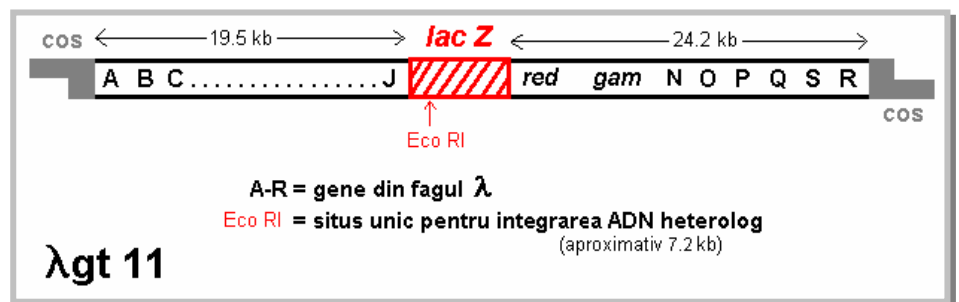


Fig.3.15. Vectorul λ gt 11.

Vectorul λ gt 11

Vectorii din seria λ gt11 și λ gt18-23 sunt tot vectori de insertie, dar nu sunt numai pentru clonare moleculară, ci permit și exprimarea ADN heterolog inserat, sub forma unei proteine de fuziune cu β -galactozidaza și, ca urmare, recombinanții sunt Lac⁻ (atunci când fragmentul de β -galactozidaza este complexat cu proteina heterologă el nu mai poate complementa cu fragmentul de β -galactozidaza codificat de cromosomul gazdei). deseori, acești vectori sunt folosiți în experimente de screening imunologic, fie al plajelor, fie al coloniilor bacteriene.

Vectorul λ gt 11 (Fig.3.15.) este folosit de regulă pentru screening imunologic. Fragmentele de ADN (de până la 7.2 kb) sunt clonate în unicul situs pentru EcoRI localizat în gena **lacZ**, permițând astfel exprimarea unei proteine de fuziune dacă secvența clonată este "în-frame" cu gena **lacZ**.

Caracteristici genetice

Substituție	nu
Insertie	da (gena <i>lacZ</i>)
Statusul <i>red/gam</i> al vectorului	<i>red⁺ gam⁺</i>
Statusul <i>red/gam</i> al recombinanților	<i>red⁺ gam⁺</i>
Situs <i>chi</i> prezent în recombinanți	nu
Propagare în gazde <i>recA⁻</i>	da
Selecție <i>Spi</i>	nu

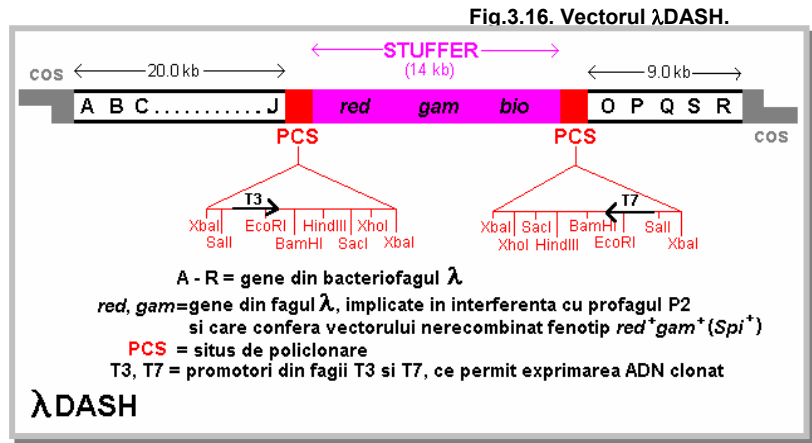
Situsuri de clonare

Situs	Insertie/ Substituție	Dimensiunea (kb)			Fenotipul Recombinanților
		Brațul stâng	insert	Brațul drept	
EcoRI	insertie	19.5	0-7.2	24.2	Lac ⁻

Vectorul λDASH

Vectorul λDASH (Fig.3.16.) este un vector de substituție la care regiunea stuffer conține genele **red**, **gam** și **bio**. Această regiune este flancată de 2 situsuri de policlonare (PCS) constituite din câte 7 situsuri de restricție (XbaI, Sall, EcoRI, BamHI, SacI, XhoI). În interiorul celor 2 situsuri de policlonare se găsesc și promotorii **T3** și **T7** care permit sinteza de sonde ARN sau chiar de proteine heterologe fără o prealabilă subclonare a ADN heterolog.

Prezența genelor **red** și **gam** în regiunea înlocuită de ADN heterolog face ca vectorii nerecombinanți să aibă fenotip **red⁺gam⁺(Spi⁺)**, iar cei recombinanți, fenotip **red⁻gam⁻(Spi⁻)**.



Caracteristici genetice

Substituție	da (genele <i>red</i> , <i>gam</i> și <i>bio</i>)
Insertie	nu
Statusul <i>red/gam</i> al vectorului	<i>red⁺gam⁺</i>
Statusul <i>red/gam</i> al recombinanților	<i>red⁻gam⁻</i>
Situs <i>chi</i> prezent în recombinanți	probabil
Propagare în gazde <i>recA⁻</i>	nu
Selecție <i>Spi</i>	da

Situsuri de clonare

Situs	Insertie/ Substituție	Dimensiunea (kb)			Fenotipul Recombinanților
		Brațul stâng	insert	Brațul drept	
XbaI, Sall, EcoRI, BamHI, HindIII, SacI, XhoI	substituție	20	9-22	9	Spi ⁻

VECTORII λZAP

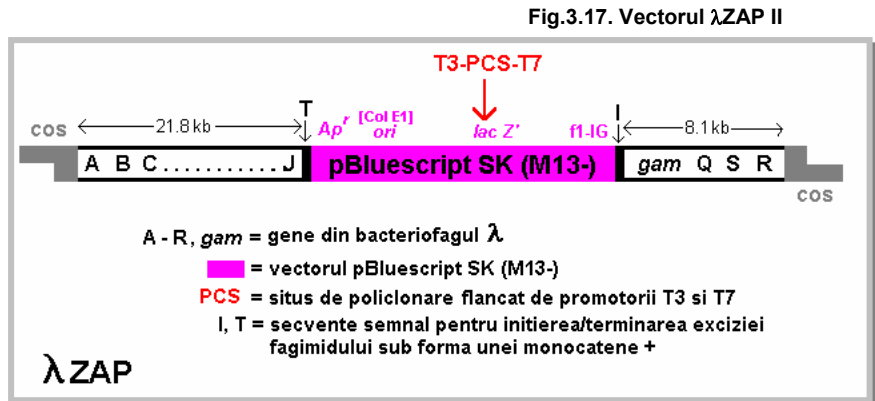
Vectorul λZAP (Fig.3.17.) este un vector de inserție complex. În regiunea centrală, neesențială, în locul genelor fagice, conține vectorul fagimid pBluescript SK (M13-). În regiunea amino-terminală a genei *lac Z'* din acest fagimid se găsește un situs de policlonare (PCS) în interiorul căruia se inseră de fapt ADN heterolog.

Vectorul plasmid din interiorul lui λZAP are rolul de a facilita experimentele de secvențiere ADN și ARN, precum și obținerea de sonde ARN cu ajutorul promotorilor T3 și T7 ce flachează ADN heterolog clonat. Totodată, un asemenea sistem genetic permite obținerea de proteine de fuziune cu βgalactozidaza.

ADN corespunzător vectorului pBluescript SK (M13-) poate fi excizat (Fig.3.18. și Fig.3.19.) în prezența fagilor helper f1 sau M13. λZAP conține 2 secvențe semnal necesare pentru inițierea exciziei (I) și pentru terminarea acesteia (T).

Caracteristicile genetice

Substituție	da (de la T până la I)
Insertie	nu
Statusul <i>red/gam</i> al vectorului	<i>red⁺gam⁺</i>
Statusul <i>red/gam</i> al recombinanților	<i>red⁺gam⁺</i>
Situs <i>chi</i> prezent în recombinanți	probabil
Propagare în gazde <i>recA⁻</i>	da
Selecție <i>Spi</i>	nu



Situsuri de clonare

Situs	Insertie/ Substituție	Dimensiunea (kb)			Fenotipul Recombinanților
		Brațul stâng	insert	Brațul drept	
SacI, NotI, XbaI, SpeI, EcoRI, XhoI	insertie	21.8	0-10	8.1	Lac ⁻

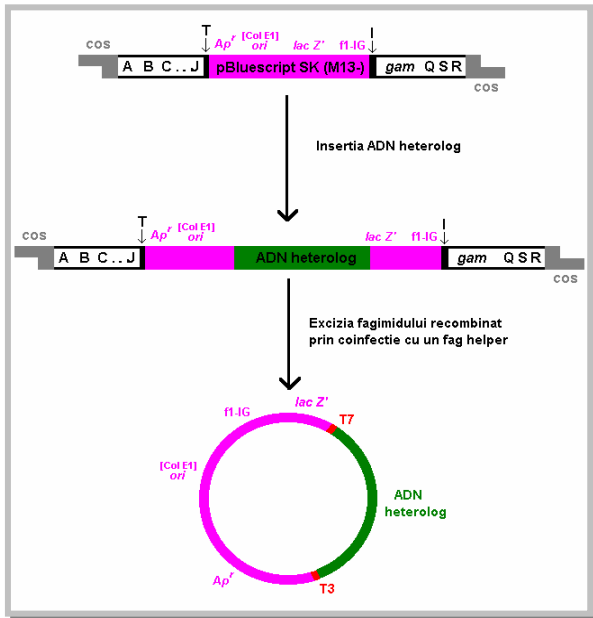


Fig.3.18. Schema clonării în λZAP II.

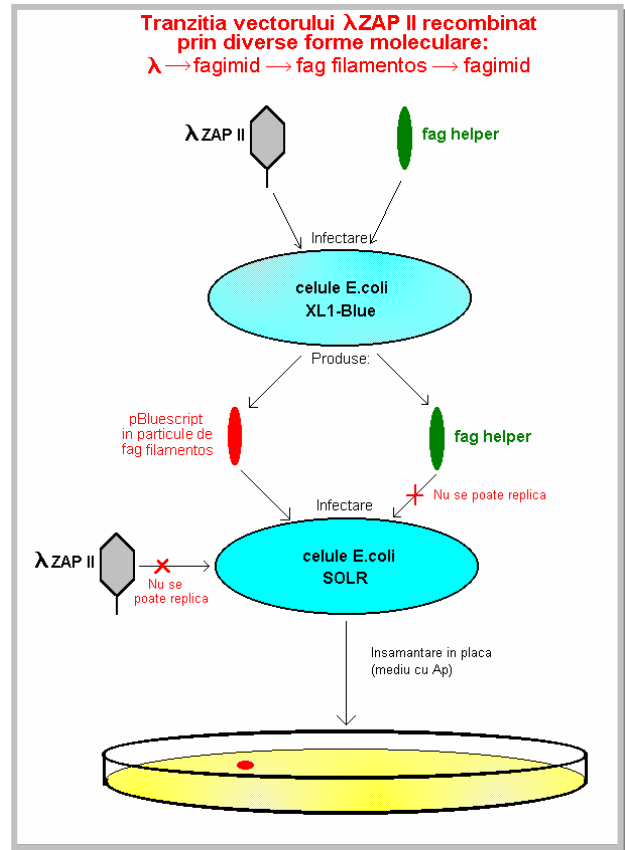


Fig.3.19. Tranziția vectorului λZAP II recombinat prin diverse forme moleculare.

3.1.5. VECTORI DE CLONARE HIBRIZI DE TIP COSMIDE

Cosmidele sunt vectori hibridi ce conțin ADN plasmidial și situsul **cos** din genomul fagului λ. Prezentând secvența **ori** din plasmidul Col E1 și gena de rezistență la ampicilină (**Ap^r**), cosmidele se pot replica și menține în celula bacteriană în forma pasmidială (CCC) și permit selecția transformanților pe mediu cu ampicilină.

Situsul **cos** permite împachetarea *in vitro* a vectorului recombinat (obținere de particule fagice mature) și, implicit, propagarea sa prin transducție sau transfecție.

Dintre cele 2 forme moleculare, plasmid și "genom fagic", cea de-a doua formă este cea care permite menținerea și propagarea stabilă a unui ADN heterolog de dimensiuni mari. Acești vectori permit clonarea unor fragmente mari de ADN genomic, de aproximativ 45 kb, permițând astfel propagarea unor gene eucariote în întregime într-o singură moleculă de ADN recombinant. Insertul acceptat de cosmide este mult mai mare decât în cazul vectorilor derivați din fagul λ (aproximativ 24 kb), ceea ce reprezintă un avantaj în realizarea băncilor genomice la eucariote.

O altă utilizare a cosmidelor este clonarea și analiza unei regiune de ADN genomic ce face parte dintr-o familie de gene. De exemplu, genele mamaliene pentru globine, care sunt cuprinse într-o regiune de 75 kb, pot fi clonate în doar 2 specii moleculare de cosmide.

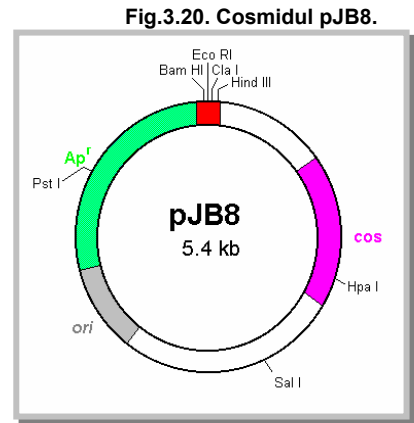
COSMIDE pentru PROPAGAREA ADN heterolog eucariot în E. coli

Asemenea cosmide au o singură secvență de control al replicării, **ori** din Col E1, permițând astfel replicarea doar în celulă bacteriană.

Cosmidul pJB8 (Fig.3.20.)

Acest vector are 5.4 kb și conține următoarele secvențe:

5. **ori** din plasmidul Col E1, care îi permite replicarea de tip plasmidial în celule de *E.coli*
6. gena de rezistență la ampicilină (**Ap^r**) ce reprezintă markerul de selecție a transformanților pe mediu cu acest antibiotic
7. situsul **cos** (derivat din vectorul Charon 4A) care permite împachetarea vectorului recombinat în particule fagice mature
8. regiunea **PCS** care conține situsuri pentru 4 endonucleaze de restricție (BamH I, EcoR I, Cla I, Hind III)



Strategia de clonare în pJB8 (Fig.3.21.)

- 1) Se realizează 2 experimente separate de digestie enzimatică a moleculelor de cosmid cu Hind III și, respectiv, Sal I. Se obțin molecule lineare de vector cu capete coezive Hind III și, respectiv, Sal I.
- 2) Ambele tipuri de molecule lineare se supun apoi (tot separat) unei digestii cu BamH I, rezultând, deci, molecule lineare cu capete coezive de BamH I; din moleculele digerate anterior cu Sal I, rezultă în urma digestiei cu BamH I, 2 tipuri de fragmente: unele ce conțin ori și Ap^r și, altele ce conțin cos; pentru etapele următoare ale clonării se aleg fragmentele ce conțin situsul cos.
- 3) ADN genomic eucariot se digeră cu endonuclează de restricție Mbo I, aceasta enzimă fiind izoschizomeră cu BamH I.
- 4) fragmentele lineare de vector obținute în urma digestiei cu BamH I se amestecă cu fragmentele lineare de ADN genomic obținute prin digestia cu Mbo I și se adaugă T4-ADN-ligază. Rezultă molecule lineare, recombinante, ce conțin: cos-ori-Ap^r-ADN heterolog-cos.
- 5) Aceste fragmente sunt supuse unui proces de împachetare *in vitro*, proces în care etapa inițială este realizată de enzima terminaza A - o endonuclează ce recunoaște specific situsurile cos, rupând legăturile fosfodiesterice în ambele catene de la acest nivel. Rezultatul împachetării îl reprezintă particule fagice, λ mature, capabile de transducție sau transfecție, particule ce nu conțin însă genomul, ci cosmidul recombinat.
- 6) Poate fi efectuată o infecție a unei tulpini bacteriene cu aceste particule fagice, în interiorul celulelor infectate realizându-se circularizarea vectorului recombinat și reformarea structurii plasmidiale. Păstrarea însă intactă și stabilă în timp a ADN heterolog clonat este obținută doar în particulele fagice.

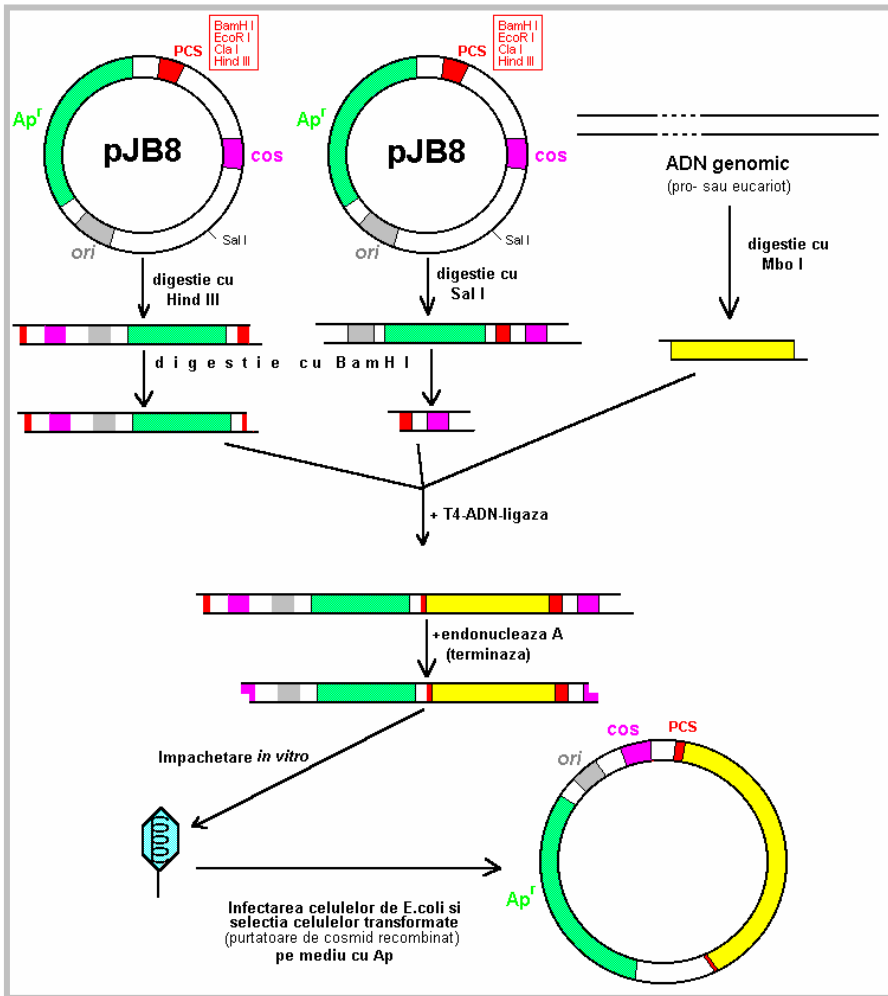


Fig.3.21. Schema clonării moleculare în cosmidul pJB8.

Cosmidul c2RB (Fig.3.22.)

Acest cosmid are o dimensiune de 6.8 kb și conține următoarele secvențe:

- gena de rezistență la ampicilină (**Ap^r**)
- gena de rezistență la kanamicină (**Km^r**)
- secvența **ori** din plasmidul Col E1
- regiunea **PCS** ce conține 4 situsuri de restricție:

BamH I, EcoR I, Cla I, Hind III

- **2 situsuri cos** ce flanchează gena Km^r

În timpul împachetării se pierde un fragment de 1.7 kb, ce conține un situs **cos** și gena Km^r, ca atare, recombinanții vor fi Km^s.

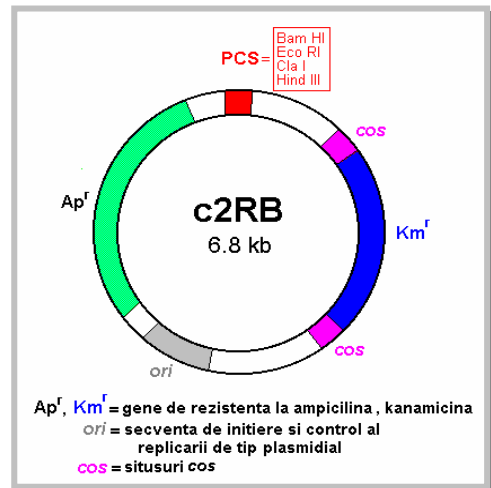


Fig.3.22. Cosmidul c2RB.

Strategia de clonare în c2RB (Fig.3.23.)

1) Se realizează o digestie dublă a cosmidului c2RB, cu 2 endonucleaze de restricție, BamH I și Sma I, ceea ce "sparge" vectorul în 2 tipuri de fragmente:

- S** - parte din gena Km^r - cos - parte din PCS - **B**
- B** - parte din PCS - gena Ap^r - ori - cos - parte din gena Km^r - **S**

fiecare fragment având un cap coeziv creat de enzima Sma I (S) și un cap coeziv creat de enzima BamH I (B)

2) ADN genomic eucariot se digeră cu endonucleaza de restricție Mbo I, această enzimă fiind izoschizomeră cu BamH I.

3) Fragmentele de ADN genomic se adaugă la fragmentele de vector și, în prezența ADN-ligazei de fag T4, are loc refacerea legăturilor fosfodiesterice la situsurile specifice pentru BamH I/Mbo I, rezultând o moleculă lineară (vector recombinat) ce are inserat în PCS un fragment de ADN eucariot.

4) Moleculele lineare de vector recombinat se supun unui proces de împachetare *in vitro* în particule λ mature cu care apoi,

5) Se infectează celule de *Escherichia coli* și se selectează clonele recombinante ce au fenotip Ap^rKm^s. Din aceste celule se pot recupera moleculele circulare ale vectorului recombinat, constatându-se că în timpul împachetării s-a pierdut un fragment de 1.7 kb ce conținea gena Km^r și unul din cele 2 situsuri cos.

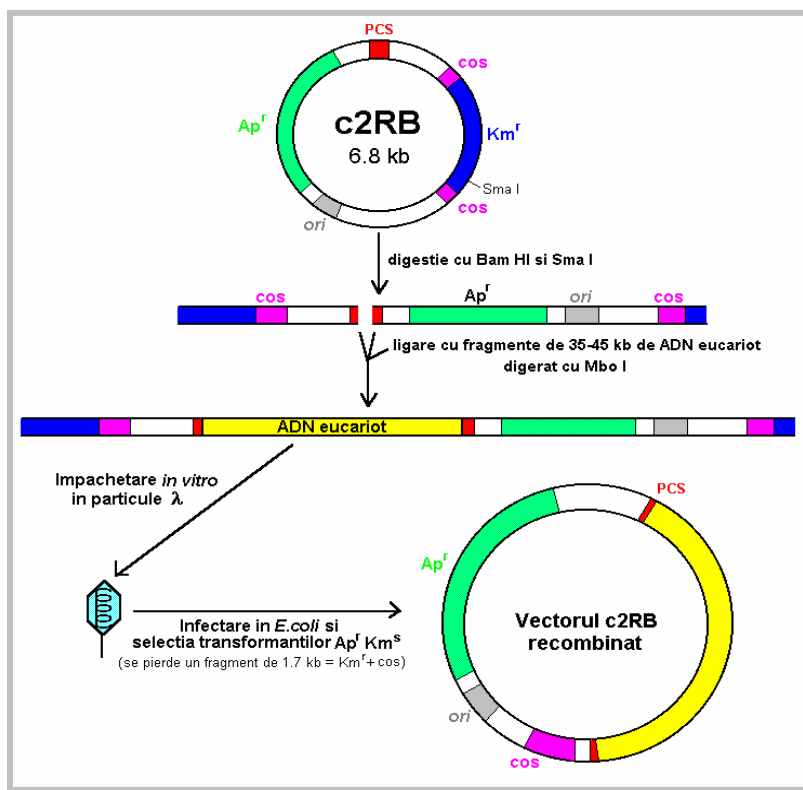


Fig.3.23. Schema clonării moleculare în cosmidul c2RB.

COSMIDE pentru transfecția CELULELOR MAMALIENE

Au fost construite o serie de cosmide pentru clonare de gene în celule mamaliene. Acești vectori diferă unul de celălalt prin 2 tipuri de regiuni:

9. markerii selectabili în celule pro- și eucariote
10. situsurile de restricție ce pot fi folosite în clonare

Cosmidele pWE 15 și pWE 16 (Fig.3.24 și 3.25)

Aceste 2 cosmide au fost construite pentru a simplifica procesul de "căutare" ("walking" = scanare) de la o clona cosmidială la alta.

Regiunea PCS este organizată astfel:

EcoRI - NotI - T3 - BamHI - T7 - NotI - EcoRI

Fragmentele de ADN eucariot se clonează în situsul BamHI.

Replicarea vectorului în celule procariote este asigurată de secvența **sori-Col E1t**, iar bacteriile transformate sunt selectate pe baza markerului **Ap^r**.

Replicarea vectorului în celule mamaliene este asigurată de **sori-SV 40t**, iar celulele transformate sunt selectate pe baza markerului:

- © gena de rezistență la neomicina (**Neo^r**) prezentă în pWE 15
 într-o forma (SV2-*neo*) ce poate fi exprimată în celule mamaliene
- © gena murină dihidrofolat-reductaza (**DHFR**) prezentă în pWE 16

Cei 2 promotori **T3** și **T7** sunt folosiți pentru procese de transcriere *in vitro*, ceea ce conduce la obținerea de sonde ARN, sau și de traducere *in vitro*, ceea ce conduce la obținerea de proteine heterologe.

Sondele ARN astfel obținute sunt, de regulă, folosite pentru identificarea clonelor "suprapuse" din cadrul unei biblioteci de cosmide, proces ce poartă numele de **scanare** ("walking") a unei biblioteci de cosmide.

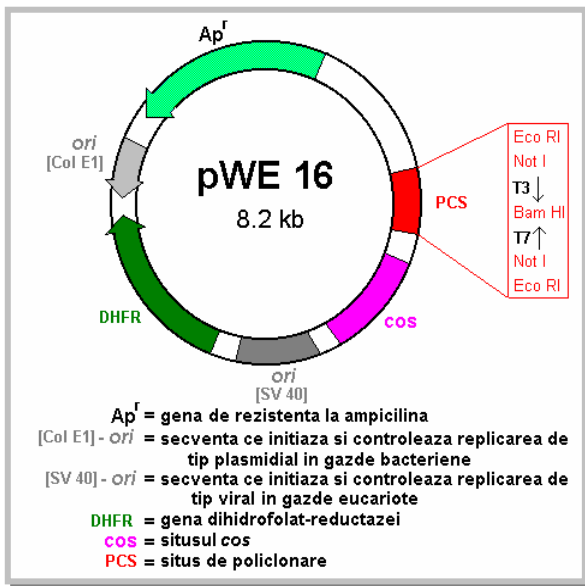


Fig.3.24. Cosmidul pWE 15.

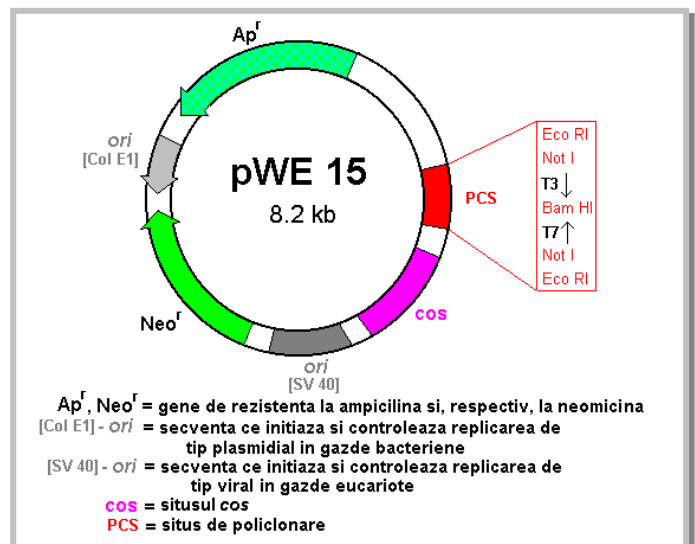


Fig.3.25. Cosmidul pWE 16.